

9. Протеиновое питание молодняка крупного рогатого скота: монография / В. Ф. Радчиков [и др.]; РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». – Жодино, 2013. – 118 с.
10. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Изд. 3-е, ис-правл. – Мн.: Высшэйшая школа, 1973. – 320 с.
11. Суханова, С. Ф. Влияние энергетического питания и возраста на продуктивность и резистентность коров / С. Ф. Суханова, Г. С. Азаубаева // Кормление сельскохозяйственных животных и кормопроизводство. – 2008. – № 7. – С. 17-19.
12. Энергетическое питание молодняка крупного рогатого скота: монография / В. Ф. Радчиков [и др.]; РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». – Жодино, 2014. – 165 с.

УДК 636.2.034.636.087.7

ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ МЕТОДОВ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ОВЕЦ ПО STR-ЛОКУСАМ

Е. С. Чебуранова, О. А. Епишко

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь (Республика Беларусь, 230008,

г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: echeburanova@inbox.ru)

Ключевые слова: STR-локус, полиморфизм, овцы, микросателлиты, гетерозиготность.

Аннотация. Целью данного исследования является оптимизация системы методов достоверности происхождения и анализ генетического разнообразия популяции овец, содержащихся на сельскохозяйственных предприятиях Республики Беларусь с использованием панели из 12 микросателлитных локусов, обладающих высокой информативностью. Установлено, что среднее значение уровня полиморфности по всем исследуемым микросателлитным локусам составило 3,880. В 12 микросателлитных локусах самое высокое значение гетерозиготности было (0,969) в локусах INRA023 и OarFCB20, а самое низкое значение было (0,925) в локусе ETH152. Среди изучаемой популяции овец генетическое равновесие было нарушено, что характеризует популяцию как гетерогенную, а локусы характеризуются высокой степенью полиморфности, что дает возможность точнее оценить гетерозиготность популяции, т. е. ее генетическое разнообразие. Все изученные STR-локусы в группе исследованных животных имели $PIC > 0,5$, что указывает на их высокую информативность в качестве маркеров для установления их происхождения.

OPTIMIZATION OF THE SYSTEM OF METHODS OF RELIABILITY OF ORIGIN AND STUDY OF SHEEP POLYMORPHISM BY STR-LOCI

E. S. Cheburanova, O. A. Epishko

EI «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus (Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: echeburanova@inbox.ru)

Key words: STR-loci, polymorphism, sheep, microsatellite, heterozygosity.

Summary. The purpose of this study optimizes the system of methods of reliability of origin and analyze the genetic diversity of the sheep population kept in agricultural enterprises of the Republic of Belarus using a panel of 12 microsatellite loci with high informativeness. The average value of the polymorphism level for all the microsatellite loci under study was 3,880. Heterozygosity was evaluated for each locus. In 12 microsatellite loci, the highest heterozygosity was 0,969 in the INRA023 and OarFCB20 loci, and the lowest value was 0,925 in the ETH152 locus. Among the studied sheep population, genetic equilibrium was disturbed, which characterizes the population as heterogeneous and loci are characterized by a high degree of polymorphism, which makes it possible to more accurately assess the heterozygosity of the population, that is, its genetic diversity. All studied STR loci in the group of studied animals had PIC > 0.5, indicating their high informativity as markers for establishing their progression.

(Поступила в редакцию 01.06.2020 г.)

Введение. В мировом племенном животноводстве, в т. ч. и Республике Беларусь, ранее для оценки достоверности происхождения животных использовали иммуногенетические маркеры, однако с достижениями молекулярной биологии в качестве альтернативы серологическим методам разработан метод анализа ДНК по STR-локусам, являющийся более информативным, который предложен как основной для установления достоверности происхождения сельскохозяйственных животных. Сегодня данный метод, основанный на анализе сателлитной ДНК, нашел широкое применение в генетике и селекции овец. Локусы сателлитной ДНК имеют определенное положение в геноме, каждый локус содержит определенное число аллелей, различающихся по числу пар оснований. По своей структуре сателлит представляет собой участок ДНК, содержащий ряд коротких нуклеотидных повторов – мотивов, ограниченный с двух сторон уникальными последовательностями. Более информативны в этом плане микросателлитные последовательности (STR-локусы) [6].

ДНК-микросателлиты – это первые, полученные с использованием полимеразной цепной реакции, высокополиморфные маркеры для индивидуальных локусов. Они относятся к диспергированным тандем-

но повторяющимся последовательностям ДНК (например, CACACA-CACACACACA), как и минисателлиты, но единицы повторов (ди-, три- и тетрануклеотиды) и общий размер повторяющейся области существенно короче (как правило, не более 100 п. н.). Эти маркеры известны под несколькими названиями: микросателлиты, STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), SSR (simple sequence repeat), STR (short tandem repeat).

В 2013 г. в Республике Беларусь вступил в силу Закон «О племенном деле в животноводстве», определяющий порядок проведения генетической экспертизы племенных животных на достоверность происхождения, которая осуществляется методом ДНК-генотипирования по STR-локусам [8]. Генетической экспертизе подлежат племенные производители сельскохозяйственных животных, быки-производители, ремонтные бычки, хряки-производители, ремонтные хряки, жеребцы-производители, ремонтные жеребчики, а также бараны-производители, ремонтные баранчики. Советом Министров в Республике Беларусь разработан и утвержден комплекс мер по развитию овцеводства в целях повышения конкурентоспособности отрасли [9].

Овцеводство в Беларуси является неотъемлемой частью народнохозяйственного производства страны и базируется в основном на производстве шерсти и мяса. В республике имеется всего 87,7 тыс. гол. овец, в т. ч. в общественном секторе – 13,5 тыс. гол., в фермерских хозяйствах – 16,1 тыс. голов, в частном секторе – 58,1 тыс. гол. Основным фактором повышения уровня племенной работы в овцеводстве служит контроль достоверности происхождения.

Согласно рекомендациям ISAG, типирование овец по локусам микросателлитов ДНК должно проводиться на генетических анализаторах корпорации Applied Biosystems, что позволяет разным лабораториям работать по единой технологии и получать сопоставимые результаты. Панель микросателлитов содержит 13 STR-локусов (12 для идентификации и один, определяющий пол), которые равномерно распределены по всему геному, высокополиморфны и могут быть идентифицированы по образцам ДНК с использованием полимеразной цепной реакции. Эта технология позволяет определять степень родства с точностью до 99,999 %, учитывая тот факт, что нет тест-систем для контроля достоверности овец, актуальным является разработка собственных методик.

На территории Республики Беларусь до сих пор не применялась генетическая экспертиза на достоверность происхождения овец, поскольку оптимизация системы методов для проведения достоверности

происхождения по STR-локусам требует значительных материальных и временных затрат.

Цель работы – оптимизация системы методов достоверности происхождения и изучение полиморфизма овец по STR-локусам.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В качестве объекта исследований использовали баранов-производителей, ремонтных баранчиков и овцематок различных пород (тексель, дорпер, Иль-де-Франс, суффолк) и их биологический материал (ушной выщип и носовая слизь), разводимых в КСУП «Хвиневичи», РУП «Витебское племпредприятие», ИООО «ИстерШип», Агроусадыба Мазычи (n = 411).

Для оптимизации системы методов достоверности происхождения по STR-локусам нами были адаптированы методы выделения ДНК, проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) и фрагментного анализа с последующей статистической обработкой полученных результатов.

Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом с двойной очисткой. Качество и концентрацию выделенных нуклеиновых кислот определяли, используя спектрофотометр Implen NanoPhotometer N60-Touch, оптимальная концентрация для проведения ПЦР и фрагментного анализа составила 10 нг/мкл [7].

Из всего многообразия STR-локусов, предложенных зарубежными учеными и международной организацией ISAG, нами были выбраны локусы McM042, McM527, CSRD247, OarFCB20, INRA063, MAF065, ETH152, INRA005, INRA006, INRA023, INRA172, MAF214, олигонуклеотидные последовательности которых были подобраны с использованием программного обеспечения Oligo Primer Analysis Software 7.0.

В таблице 1 представлены олигонуклеотидные последовательности микросателлитных локусов:

Таблица 1 – Олигонуклеотидные последовательности STR-локусов овец

Название STR-локуса	Прямая олигонуклеотидная последовательность	Обратная олигонуклеотидная последовательность
1	2	3
CSRD247	ggacttgccagaactctgcaat	cactgtggtttgtattagtcagg
ETH152	tactctgtagggcaggctgcctg	gagacctcagggtggt gatcag
INRA005	ttcaggcataccctacaccacatg	aaatattagccaactgaaaactggg
INRA006	agggaatatctgtatcaaccgcagtc	ctgagctgggggtgggagctataata

Продолжение таблицы 1

1	2	3
INRA023	gagtagagctacaagataaacttc	taactacaggggtgts gstgaactc
INRA063	gaccacaagggaattggccacagc	aaaccacagaaatgcttgggaag
INRA172	ccagggcagtaaaatgcataactg	ggccttgctagcctctgcaaac
MAF065	aaaggccagagtagtgcattaggag	ccactcctcctgagaataatacatg
MAF214	aatgcaggagatctgaggcaggacg	gggtgatcttagggaggttttggagg
McM042	catctttcaaaagaactccgaaagtg	cttggaaatccttctaactttcgg
McM527	gtccattgcctcaaatcaattc	aaaccacttgactactcccca
OarFCB20	ggaaaaccccatatatactatatac	aaatgtgtttaagattccatacatgtg

Для качественного проведения полимеразной цепной реакции нами были подобраны оптимальная концентрация компонентов реакционной смеси. Общий объем смеси составил 14 мкл и включал ПЦР буфер 10-х, 50 mM MgCl₂, dNTP 2,0 mM, 15 пМ каждого праймера, 0,25 U Tag-полимеразы, 10 нг/мкл ДНК и H₂O до 14 мкл.

Для амплификации ПЦР использовали термоциклер C1000 Touch™ BIORAD. Подобраны оптимальные температурные и временные параметры проведения этапов денатурации, отжига праймеров и элонгации.

Параметры ПЦР: денатурация – 95 °С – 4 мин; 35 циклов: денатурация – 94 °С – 30 с; отжиг олигонуклеотидных последовательностей 57 °С – 45 с; элонгация – 72 °С – 45 с; финальная элонгация – 72 °С – 10 мин.

После проведения ПЦР продукт амплификации подвергали денатурации в термостате при температуре 95 °С в течение 3 мин, с последующим охлаждением на льду в течение 10 мин. Для проведения фрагментного анализа использовали генетический анализатор 3500 (Applied Biosystems), обработку данных проводили с помощью специализированного программного обеспечения GeneMapper 3.0.

Полиморфизм STR-локусов изучали по следующим показателям: частота встречаемости аллелей; число аллелей в локусе (N_a); среднее число аллелей на локус (N_V); A_e – уровень полиморфности, эффективное число аллелей; процент гомо- и гетерозиготных генотипов в каждом микросателлитном локусе; наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность; индекс фиксации Райта; величина информативной ценности использованных маркеров; согласно формулам:

$$p = n/2N,$$

где p – частота аллеля; n – число животных носителей данного аллеля; N – общее количество обследованных животных.

$$H_o = h_j/n,$$

где H_o – наблюдаемая гетерозиготность по одному локусу; h_j – количество гетерозиготных генотипов в локусе; n – общее количество генотипов в локусе.

$$A_e = 1/\sum p_{ij}^2,$$

где A_e – уровень полиморфности (показатель числа действующих эффективных аллелей), p – частота встречаемости j аллеля для локуса i и суммирование распространяется на n аллелей.

$$H_e = 1 - \sum p_i^2,$$

где H_e – ожидаемая гетерозиготность по одному локусу; p_i – частота встречаемости i -го аллеля.

$$F_{is} = (H_e - H_o)/H_e,$$

где F_{is} – индекс фиксации Райта, H_e – ожидаемая гетерозиготность, H_o – наблюдаемая гетерозиготность.

$$PIC_i = 1 - \sum p_{ij}^2,$$

где PIC_i – полиморфное информационное содержание i -го локуса; p – частота j аллеля для локуса i и суммирование распространяется на n .

Результаты исследований и их обсуждение. В результате оптимизации системы методов достоверности происхождения по STR-локусам нами было проведено генотипирование овец, которое позволило изучить полиморфизм изучаемой популяции по STR-локусам.

Таблица 2 – Характеристика овец по STR-локусам

STR-локус	Среднее число аллелей на локус (NV)	Ожидаемая гомозиготность (C_e)	Уровень полиморфности (A_e)	Наблюдаемая гетерозиготность (H_o)	Ожидаемая гетерозиготность (H_e)	Индекс фиксации (F_{is})	Величина информативной ценности (PIC)
McM042	7,75	0,0559	5,2198	0,8180	0,9668	0,1535	0,7963
INRA006	8	0,0399	4,3918	0,5971	0,9601	0,3757	0,7420
McM527	5,5	0,0530	3,9928	0,7098	0,9470	0,2478	0,7414
ETH152	5,75	0,0916	3,0973	0,5372	0,9084	0,3854	0,6232
CSRD247	8,75	0,0669	3,1564	0,5818	0,9331	0,3669	0,6482
OarFCB20	8	0,0602	3,5042	0,7586	0,9329	0,1867	0,6729
INRA172	5,5	0,3437	2,2007	0,4382	0,5022	0,0814	0,3696
INRA063	9,75	0,0335	4,2811	0,7112	0,9665	0,2634	0,7520
MAF065	4,5	0,1221	2,8743	0,6463	0,8779	0,2525	0,5932
MAF214	5,75	0,0794	3,0347	0,7439	0,9206	0,1767	0,6277
INRA005	9	0,0235	5,6188	0,7878	0,9765	0,1929	0,8090
INRA023	7	0,0434	5,1988	0,6610	0,9566	0,3117	0,7680
Среднее значение	7,1042	0,0844	3,8809	0,6659	0,9040	0,2496	0,6786

Учитывая тот факт, что уровень полиморфности является показателем эффективно действующих в популяции аллелей, эта величина коррелирует с числом аллелей, выявленных в каждом из исследованных локусов (т. е. чем больше выявлено аллелей, тем больше уровень полиморфности).

В исследуемой популяции овец число идентифицированных аллелей (N_a) варьировало от 2 до 14, причем минимальное количество аллелей выявлено в локусе MAF214, а максимальное – в локусах CSRD247 и INRA063, что характеризует их как высокополиморфные. Средний показатель уровня полиморфности (A_e), рассчитанного на locus, составил 3,880.

В вопросах динамики генетического состава популяций важным параметром является гетерозиготность. Гетерозиготность возникает при слиянии разнокачественных гамет в гетерозиготу. Гетерозиготность играет положительную роль в адаптации популяций к изменяющимся условиям окружающей среды, а также в микроэволюционном процессе. Поэтому ее оценка в настоящее время необходима практически во всех популяционно-генетических исследованиях, а степень наблюдаемой гетерозиготности (H_o) является мерой генетической изменчивости в популяции.

В исследуемой группе животных наблюдаемая гетерозиготность (H_o) варьировала от 23 % (locus MAF214) до 92 % (locусы INRA006 и OarFCB20), а ожидаемая (H_e) – от 46 % (locус MAF214) до 89 % (locус OarFCB20). В локусах McM042, INRA006, OarFCB20 и INRA172 наблюдаемая гетерозиготность превышала ожидаемую на 0,01, 0,04, 0,03 и 0,04 соответственно. В остальных локусах ожидаемая гетерозиготность превышала наблюдаемую.

Установить связь между индивидуумами отдельной популяции и популяцией позволил индекс фиксации F_{is} . Поскольку данный показатель количественно отражает отклонение частот встречаемости гетерозиготных генотипов от теоретически ожидаемых по Харди-Вайнбергу доли гетерозигот при случайном спаривании внутри популяции, он может рассматриваться в качестве одного из критериев инбредности популяции. При этом положительное значение индекса F_{is} означает нехватку гетерозигот в данной популяции, в то время как отрицательное значение индекса указывает на избыток гетерозигот.

В ходе исследований было установлено, что по полиморфному информационному содержанию локуса (PIC) микросателлитный locus INRA172 $F_{is} = 0.0282$ был умеренно информативным ($0,25 < PIC < 0,5$), в то время как другие 12 микросателлитных locусов являлись высокоинформативными ($PIC > 0,5$). Известно, что микросателлитные locусы должны иметь, по крайней мере, 4 аллеля, чтобы считаться эффективными для оценки генетического разнообразия [1]. Данному критерию соответствуют и исследуемые 12 микросателлитных locусов, что указывает на их высокую информативность в качестве маркеров для установления происхождения овец.

Заключение. Таким образом, обнаруженные особенности STR-полиморфизма овец, разводимых в Беларуси, позволяют более эффективно использовать отдельные локусы для различных целей генетико-популяционных исследований. Результаты исследований позволяют рекомендовать локусы McM042, INRA006, McM527, ETH152, CSRD247, OarFCB20, INRA172, INRA063, MAF065, MAF214, INRA005, INRA023 для характеристики генофонда овец, оценки генетической дифференциации, идентификации групп животных, а высокий уровень полиморфизма и кодоминантный характер наследования открывают возможность поиска взаимосвязей аллельных вариантов микросателлитных локусов с продуктивными признаками животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barker, J. S. F. Global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds / J. S. F. Barker // *Proceedings of the 5th World congress on genetics applied to livestock production*, Ontario, 7-12 aug. 1994 / Univ. of Guelph ; ed.: C. Smith [et al.]. – Ontario, 1994. – Vol. 21. – P. 501-508.
2. Microsatellite panel for evaluating the accuracy of sheep origin / Cheburanova E. [et al.] // Научно-практич. Жур. Запад-Казах. Аграр. Технич. Унив. Им. Жангир хана «Наука и образование», № 1 (50) 2018. – P. 28-31.
3. A second-generation linkage map of the sheep genome // Maurico J. de Gortari [et al.] // *Mammalian Genome* 9, 204-209 (1998).
4. Application of 11 STR markers for the evaluation of genetic variation in sheep // A. Szumiec. [et al.] // *Proceedings ICAR Conference 2018*, Auckland. – P. 141-145.
5. Tomasco, Ivanna Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks / Ivanna Tomasco, G. Wlasiuk and E. P. Lessa // *Genetics and Molecular Biology*, 25, 1, 37-41 (2002).
6. Weimann, C. Suitability of microsatellites BM1329 and OarAEIOL as markers for the introgression of the Fee (B) locus into different sheep breeds / C. Weimann, B. Leyhe-Horn, M. Gauly // *Arch. Tierzucht*. 2001. Vol. 44. – P. 435-440.
7. Чебуранова, Е. С. Методические аспекты проведения достоверности происхождения племенных овец разводимых в Беларуси / Е. С. Чебуранова, О. А. Епишко // Мат. Междун. научн.-практич. Интернет-конф. «Современные проблемы и достижения сельского хозяйства в XXI веке», 30.03.2018 г. – С. 42.
8. Закон Республики Беларусь «О племенном деле в животноводстве» от 20 мая 2013 г. № 24-З.
9. Постановление Совета Министров Республики Беларусь 30.04.2019 № 268 «Об утверждении комплекса мер по развитию овцеводства в Республике Беларусь на 2019-2025 годы».